

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-505048

(43) 公表日 平成8年(1996)6月4日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 0 1 H 5/00	Z N A A	8502-2B	
A 0 1 N 37/46		9155-4H	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		7729-4B	5/00
			Z N A A
			C
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-511811  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)10月22日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)5月12日  
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 3 / 0 2 1 7 9  
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 1 1 5 1 1  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)5月26日  
 (31) 優先権主張番号 9 2 2 3 7 0 8 . 0  
 (32) 優先日 1992年11月12日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)  
 (31) 優先権主張番号 9 3 0 3 5 6 4 . 0  
 (32) 優先日 1993年2月23日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 ゼネカ・リミテッド  
 イギリス国 ロンドン ダブリュー1ワイ  
 6エルエヌ, スタンホープ ゲート 15  
 (72) 発明者 プロエカエルト, ヴィレム, フランス  
 ベルギー王国ベ—1700 デイルピーク,  
 クルイツェンボスシュトラート 26  
 (72) 発明者 カムエ, ブルーノ・フィリップ・アンゲロ  
 ベルギー王国ベ—1652 アルゼンベル  
 ク, ヨット・ペー・ヴォウタースシュトラ  
 ート 109アー  
 (74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 殺生物性のキチン結合性蛋白質

(57) 【要約】

種子から単離しうる殺生物性蛋白質が解明された。これらの蛋白質はキチン結合性植物蛋白質の共通システイン／グリシンドメインを含むアミノ酸配列を有するが、病原性真菌に対して実質的に、より良好な活性、より高い、酸性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸の比率、および／または分節菌体分枝を増大させる抗真菌活性を示す。トウガラシ属、コバンソウ属および近縁種から単離される抗微生物性蛋白質が提供される。これらの蛋白質は広範な抗真菌活性を示し、かつグラム陽性細菌に対して有効である。これらの蛋白質をコードするDNAを単離し、ベクターに取り込ませることができる。植物をこのDNAで形質転換することができる。これらの蛋白質は、抗真菌薬または抗微生物として農業または薬剤に使用しうる。該蛋白質を発現するトランスジェニック植物は向上した病害抵抗性を示す。

## 【特許請求の範囲】

1. キチン結合性植物蛋白質の共通システイン／グリシンドメインを含むアミノ酸配列を有し、かつ下記よりなる群から選ばれる特性のうち少なくとも1つを備えた抗微生物性蛋白質：

(a) キチン結合性植物蛋白質より実質的に良好な、植物病原性真菌に対抗する活性；

(b) キチン結合性植物蛋白質より高い、酸性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸の比率；

(c) 植物病原性真菌に対する分節菌体分枝を生じる活性。

2. 実質的に図4または図11に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の抗微生物性蛋白質。

3. オリゴマーであり、かつ実質的に図4または図11に示されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドを含む、請求項1に記載の蛋白質。

4. 純粋な蛋白質Ca-AMP1である、請求項1に記載の蛋白質。

5. 純粋な蛋白質Bm-AMP1である、請求項1に記載の蛋白質。

6. 植物の種子から単離しうる、請求項1に記載の蛋白質。

7. トウガラシ属 (C a p s i c u m) の種子、コバンソウ属 (B r i z a) の種子、カタボジウム属 (C a t a p o d i u m) の種子、バプティシア属 (B a p t i s i a) の種子、ミクロセンシス属 (M i c r o s e n s i s) の種子、ヒエンソウ属 (D e l p h i n i u m) の種子よりなる群から選ばれる種子から単離しうる、請求項6に記載の蛋白質。

8. 合成によるものである、請求項1に記載の蛋白質。

9. 組換えDNAの発現により製造される、請求項1に記載の蛋白質。

10. 請求項1-9のいずれか1項に記載の蛋白質を含有する組成物。

11. 請求項1-7のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする、組換えDNA配列。

12. cDNAである、請求項11に記載のDNA配列。

13. ゲノム、DNAである、請求項11に記載のDNA配列。

14. 植物ゲノムから単離された、請求項11に記載のDNA配列。

15. プロモーター配列を含む、請求項14に記載のDNA配列。
16. 請求項1-7のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子から得られるプロモーター配列。
17. 請求項11に記載のDNA配列を含むベクター。
18. コードされる蛋白質が発現する状態で請求項11に記載の組換えDNAを含む生物系。
19. 微生物である、請求項18に記載の生物系。
20. 植物である、請求項18に記載の生物系。
21. 請求項11に記載の組換えDNAにより形質転換された植物。
22. 組換えDNAがCa-AMP1をコードする、請求項21に記載の植物。
23. 組換えDNAがBm-AMP1をコードする、請求項21に記載の植物。
24. 請求項21-23のいずれか1項に記載の植物の種子および子孫。
25. 請求項1-9のいずれか1項に記載の蛋白質に暴露することを含む、真菌または細菌と対抗する方法。
26. 請求項10に記載の組成物に暴露することを含む、請求項25に記載の方法。
27. 請求項1-7のいずれか1項に記載の蛋白質を含有する有機材料から該蛋白質を得るための抽出方法であって、該有機材料をマセレーションおよび溶剤抽出することを含む方法。
28. 蛋白質が次いで遠心分離、クロマトグラフィーおよび透析により精製される、請求項27に記載の抽出方法。
29. 有機材料がトウガラシ属 (Capsicum) の種子、コバンソウ属 (Briza) の種子、カタボジウム属 (Catapodium) の種子、バプティシア属 (Baptisia) の種子、ミクロセンシス属 (Microsens  
is) の種子、ヒエンソウ属 (Delphinium) の種子よりなる群から選ばれる種子を含む、請求項27に記載の抽出方法。
30. 有機材料が請求項18に記載の生物系を含む、請求項27に記載の抽出

方法。

31. 請求項 1-7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を製造する方法であって、

蛋白質の化学合成を含む方法。

32. 請求項 1-7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を製造する方法であって、  
該蛋白質をコードする組換え DNA 配列の発現を含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 殺生物性のキチン結合性蛋白質

本発明は、殺生物性 (biocidal) 蛋白質、それらの製造および使用のための方法、ならびにそれらをコードするDNA配列に関するものである。特に本発明は、トウガラシ属 (Capsicum) の種子から単離する蛋白質、およびコバンソウ属 (Briza) の種子から単離する蛋白質を含む、抗微生物性蛋白質類に関するものである。

これに関して、抗微生物性蛋白質とは下記のうち少なくとも1つの活性をもつ蛋白質として定義される：抗真菌活性（抗酵母活性を含む）；抗菌活性。活性には、たとえば部分的阻害または死滅などの一定範囲の拮抗作用が含まれる。それらの蛋白質はオリゴマーペプチドサブユニットであってもよく、または単一ペプチドサブユニットであってもよい。

トウガラシ属は50の種を含み、世界中で栽培されている多数の重要な野菜の種を含む（たとえばグリーンおよびレッドペッパー、チリ、パプリカならびにカエンネ (cayenne) ペッパー）。これらの広く栽培されている例のほかに、トウガラシ属には食用ではないが色彩豊かなそれらの果実のために栽培されている多数の種も含まれる。

コバンソウ属は多数の観賞用の草を含み、イネ科に属する。この属は、高温牧草地で見られる草の種、たとえばライグラス (rye grass) に近縁である。

植物は潜在的な侵入体と戦うために広範な一連の抗真菌活性化合物を産生するが、抗真菌活性をもつ蛋白質がこれらの防御の重要な部分を構成することがこの10年間で明らかになった。幾つかの類の蛋白質が報告されており、それにはチオニン類、 $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ類、リボソーム不活性化蛋白質およびキチナーゼ類が含まれる。この最後の群の酵素は、以下においてキチン結合性植物蛋白質と呼ばれる、より広い類に属する。基本的なキチナーゼはマメ類から（ボラー (Boller) ら、1983, *Planta*, 157: 22-31）、コムギから（モラノ (Molano) ら、1979, *J Biol Chem*, 254: 4901-4907）、タバコから（シンシ (Shinshi) ら、198

7, *Pro Nat Aca Sci USA*, 84:89-93) および他の植物から単離されている。他のキチン結合性植物蛋白質は特定の触媒活性をもち、従って単にそれらのレクチン活性について記載されているにすぎない。これらには、コムギから (ライスおよびエツラー (Rice, Etzler), 1974, *Biochem Biophys Res Comm*, 59:414-419)、オオムギから (ポーマン (Peuman) ら, 1982, *Biochem J*, 203:239-143)、イネから (ツダ (Tsuda), 1979, *J Biochem*, 86:1451-1461)、およびイラクサ類 (*stinging nettle*) から (ポーマン (Peuman) ら, 1983, *FEBS Lett*, 177:99-103) のキチン結合性レクチン類、ならびにゴムノキのラテックスからのヘベイン (*hevein*) と呼ばれる小型の蛋白質 (ファン・パリス (Van Parijs) ら, 1991, *Planta*, 183:258-264) が含まれる。

このように (本明細書に定める) キチン結合性植物蛋白質は、キチナーゼ、キチン結合性レクチン類およびヘベインからなる蛋白質群である。これらの蛋白質はすべて、システイン/グリシンに富む保存ドメインを含む (総説についてはレイケルおよびブレケルト (Raikhel, Broekaert), 1991, *Control of plant gene expression*, ベルマ (Verma DP) (編者), テルフォード・プレスを参照されたい)。この共通領域がキチン結合活性をもたらすと思われる。このドメインは40-43アミノ酸の長さであり、2回 (イラクサレクチン) もしくは4回 (コムギ、オオムギおよびイネレクチン) 反復されるか、または無関係なドメインに融合している (基本的キチナーゼおよびプロヘベイン)。ヘベイン自体は43アミノ酸の長さであり、本質的にこの保存ドメインそのものからなる (ブレケルト (Broekaert) ら, 1990, *Pro Nat Aca Sci USA*, 87:7633-7637)。ヘベインをコードするcDNAクローン (HEVI) が単離された (レイケルおよびブレケルト (Raikhel, Broekaert), 米国特許第5187262号明細書、1993年2月16日発行)。図5には下記のキチン結合性植物蛋白質中に見られるシステイン/グリシンに富む共通ド

インを示す：タバコキチナーゼ、マメキチナーゼ、ヘペイン、コムギレクチシ、イラクサレクチン。配列の一致および保存変化を囲んだ（保存変化はアミノ酸相同群FWY、MILV、RKH、ED、NQ、STおよびPAG内での置換であると考えられる；一致を最大にした場合に生じるギャップをダッシュで示す）。9アミノ酸残基を含む中央領域は、そのドメインの特に良好に保存された部分であり、下記の配列をもつ：

1	2	3	4
(トリプトファン、チロシンまたはフェニルアラニン) - グリシン -			
5			6
(トリプトファン、チロシンまたはフェニルアラニン) - システイン -			
7			8

システインー（４アミノ酸）ーシステインーシステインー（５アミノ酸）ー  
システインー（６アミノ酸）ーシステイン

-7-

レイケルおよびブレケルト, 米国特許第5187262号明細書、1993年2月16日発行)。イラクサレクチンはインビトロでヘベインより2-5倍高い水準の抗真菌活性を生じることも示された(ブレケルト(Broekaert)ら, 1989, Science, 245:1100-1102)。これらの蛋白質が植物において抵抗性を作り出すために有用であるという可能性が述べられている(たとえばパイオニア・ハイブレッドの欧州特許出願第502718号明細書)。

本発明者らは、先に、ヒユ(ハゲイトウ)属(Amaranthus)から単離された広域スペクトル抗真菌活性をもつ2種類の蛋白質(Ac-AMP類)を報告した(ブレケルト(Broekaert)ら, 1992, Biochemistry, 31:4308-4314; 国際特許出願公開WO92/21699号明細書)。これは本質的に、キチン結合性レクチン類において同定されたシステイン/グリシンドメインからなる。

本発明によれば、キチン結合性植物蛋白質の共通システイン/グリシンドメインを含むアミノ酸配列を有し、かつ下記のうち1または2以上の特性を備えた抗微生物性蛋白質が提供される:

キチン結合性植物蛋白質より実質的に良好な、植物病原性真菌に対抗する活性;  
キチン結合性植物蛋白質より高い、酸性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸の比率;  
植物病原性真菌に対する分節菌体分枝(hyphal branching)を生じる活性。

特にトウガラシ属の種の種子から単離する蛋白質、およびコバンソウ属の種の種子から単離する蛋白質が提供される。それらの抗微生物性蛋白質は、近縁種および非近縁種(カタボジウム属(Catapodium)、バプティシア属(Baptisia)、ミクロセンシス属(Microsensis)、ヒエンソウ属(Delphinium)を含む)の種子からも単離することができ、またはいずれか適切な方法で合成することができる。

本発明者らは、トウガラシ(Capsicum annuum)の種子から新規な抗微生物性蛋白質(以下、Ca-AMP1(Capsicum annuu



m a n t i - m i c r o b i a l p r o t e i n 1) と呼ぶ) を精製した。この蛋白質はキチン結合性植物蛋白質の共通システイン/グリシンドメインを共有するが、ヘベインまたはイラクサレクチンより少なくとも1桁高い、極めて有効かつ広域スペクトルの抗真菌活性を保有するので新規である。このように、これらの蛋白質配列の保存性 (たとえばCa-AMP1に関するアミノ酸配列はヘベインと65%等しい) にもかかわらず、このトウガラシ蛋白質はその抗真菌活性の効力およびスペクトルにおいて著しく改良されている。実際に、Ca-AMP1とヘベインはサイズおよびアミノ酸配列において極めて類似するが、それらの活性の水準およびスペクトルにおいて著しく異なることは注目すべきである。

また本発明者らは、コバンソウ (B r i z a m a x i m a) の種子から新規な抗微生物性蛋白質 (以下、Bm-AMP1 (B r i z a m a x i m a a n t i - m i c r o b i a l p r o t e i n 1) と呼ぶ) を精製した。この蛋白質はキチン結合性植物蛋白質の共通システイン/グリシンドメインを共有するが、極めて有効かつ広域スペクトルの抗真菌活性を保有するので新規である。このように、これらの蛋白質配列の保存性にもかかわらず、このコバンソウ蛋白質はその抗真菌活性の効力およびスペクトルにおいて著しく向上している。Bm-AMP1に関するアミノ酸配列はCa-AMP1と45%等しいが、ヘベインとはわずか35%等しい。

Ca-AMP1およびBm-AMP1の抗真菌活性は、前記のヒユ蛋白質 (A c - A M P) (ブレケルト (B r o e k a e r t) ら, 1992, B i o c h e m i s t r y, 31:4308-4314: 国際特許出願公開WO92/21699号明細書) のものに類似する: これらの蛋白質はすべて実質的にヘベインまたはイラクサレクチンより塩基性が高く、これが活性の相異に関与している可能性がある。

本発明者らは、全体的に塩基性のプロファイルを保有することが抗真菌性蛋白質の有効性に寄与することを見出した。たとえばオシロイバナ属 (M i r a b i l i s) およびダイコン属 (R a p h a n u s) から単離された異なる類の抗真菌性蛋白質の場合、より活性の高いものは常に、より塩基性の相同体である (テラ

ス (Terras) ら、1992, J Biol Chem, 267:15301-15309; カミュ (Cammue) ら、1992, J Biol Chem, 267:2228-2233)。トウガラシ (Ca-AMP1) 蛋白質の配列はヘベインのものに極めて類似するが、塩基性アミノ酸：酸性アミノ酸の比率はCa-AMP1については4：1であり、ヘベインについては4：5である（すなわちはるかに低い）。塩基性アミノ酸：酸性アミノ酸の比率はBm-AMP1については3：1である。Ca-AMP1およびBm-AMP1の塩基性が効力の向上に関与している可能性がある。従って部位特異的突然変異を利用して特定のキチン結合性植物蛋白質（たとえばヘベイン）の塩基性を高めると、特にその置換がトウガラシ (Ca-AMP1) 蛋白質において塩基性アミノ酸がある位置でなされた場合（たとえばヘベインの位置28のアスパラギン酸の交換）、またはコバンソウ (Bm-AMP1) 蛋白質において塩基性アミノ酸がある位置でなされた場合、抗真菌活性が高まると思われる。従って特定のキチン結合性植物蛋白質の構造を調整することによって、新規な、より有効な本発明の抗微生物性蛋白質を作り出すことが可能である。

多数の異なる植物種をスクリーニングした際に、本発明の蛋白質類が植物の種子にかなり共通であることが明らかになった。蛋白質の抗真菌活性をそれらが生じる予想外の形態学的作用、すなわち部分的に阻害された発芽中の真菌胞子において著しい分節菌体分枝が起こることに基づいて識別することが可能である。これはフサリウム・カルモラム (Fusarium culmorum) を用いた場合に特に顕著である。本発明者らは、ヒユ蛋白質 (Ac-AMP1) が真菌分節菌体に対して同様な作用を生じることを今回見出した。この阻害の性質は、それがアッセイに用いるカチオンの濃度に対して極めて感受性であるという事実をも特色とする。

トウガラシ蛋白質 (Ca-AMP1) とヒユ蛋白質 (Ac-AMP類) の類似性にもかかわらず、それらの一次構造および三次構造には顕著な相異がある。図5は、Ca-AMP1の配列が少なくとも42のアミノ酸残基を含むことを示す。しかしAc-AMP2はこれより短い蛋白質である：すなわち全Ac-AMP

2配列はわずか30のアミノ酸残基を含むにすぎない。さらにCa-AMP1の残りの配列は、Ac-AMP2蛋白質に見られない2個の付加的なシステイン残基

を含む。システインは蛋白質内の内部結合に関与するので、Ca-AMP1とAc-AMP2の三次構造が異なることはあり得る。

Bm-AMP1は、そのアミノ酸の総数およびそのシステイン残基の数においてCa-AMP1に類似する。Bm-AMP1とCa-AMP1が二次および三次の双方の水準でかなりの相同性を共有することはあり得る。Ca-AMP1と同様にBm-AMP1が、一部はBm-AMP1中に見られる2個の付加的なシステイン残基のためその三次構造においてAc-AMP2と異なることもあり得る。

本発明はさらに、本発明の蛋白質をコードする組換えDNA配列、および該配列を含むベクターを提供する。該DNAを生物系にクローニングまたは形質転換して、コードされた該蛋白質を発現させることができる。

さらに、本発明による抗微生物性蛋白質をコードする組換えDNAで形質転換された植物が提供される。

さらに、真菌または細菌を本発明による蛋白質に暴露することにより、真菌または細菌と対抗する方法も提供される。

Ca-AMP1およびBm-AMP1は広範な抗真菌活性を示し、かつグラム陽性細菌に対しても有効である。それぞれの蛋白質は殺真菌薬または抗生物質として、農業用または薬剤用に有用である。抗微生物性蛋白質への植物病原体の暴露は、植物に、または植物が生育する土壤に付与された前記の蛋白質を微生物内で発現させることにより達成しうる。またそれらの蛋白質は、標準的な農業技術（たとえば噴霧）により該蛋白質を植物の部分に付与することによって、真菌性または細菌性病害と対抗するために使用しうる。またそれらの蛋白質は、植物の生育中に、または収穫後の作物の保護のために、植物体内で発現させることにより真菌性または細菌性病害と対抗するために使用しうる。またそれらの蛋白質は、哺乳動物感染症を治療するための殺真菌薬として使用しうる。

本発明の抗微生物性蛋白質は、適宜な種子から単離精製するか、その既知のアミノ酸配列から人工的に合成するか、または組換えDNAの発現により適切な微生物内で産生させることができる。それらの蛋白質をトランスジェニック植物内で発現させることもできる。

Ca-AMP 1およびBm-AMP 1のアミノ酸配列は、それらがキチン結合性植物蛋白質と同類であることを示す。特にCa-AMP 1とヘベインはアミノ酸配列およびサイズが極めて類似する。Ca-AMP 1およびBm-AMP 1は本質的にそれぞれ共通のシステイン/グリシンドメインからなる。

一次構造の知見から、前記の抗微生物性蛋白質またはその一部を標準的なペプチド合成装置による化学合成により調製することができる。それにより、抗微生物性蛋白質をコードするDNA構造体を調製することもできる。DNA配列は既知のアミノ酸配列から推定するか、または植物由来のDNAライブラリーからその配列を単離することができる。

オリゴヌクレオチドプローブを既知のアミノ酸配列から誘導し、それらを用いて、前記蛋白質の一部または全部をコードするcDNAクローンにつきcDNAライブラリーをスクリーニングすることができる。これらの同じオリゴヌクレオチドプローブまたはcDNAクローンを用いてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、実際の抗微生物性蛋白質遺伝子（1または2以上）を単離することができる。それらのゲノムクローンには、植物ゲノム内で作動する制御配列が含まれる。こうして抗微生物性（または他の）蛋白質の発現を駆動するために使用しうるプロモーター配列を単離することもできる。これらのプロモーターは、特に環境条件（たとえば真菌性病原体の存在）に応答するものであってもよく、それらを用いていずれかの標的遺伝子の発現を駆動させることもできる。

次いで本発明の抗微生物性蛋白質をコードするDNA（それはcDNAクローン、ゲノムDNAクローン、または標準的な核酸合成装置を用いて調製されたDNAのいずれであってもよい）を、蛋白質または蛋白質の一部を発現しうる生物系内へクローニングすることができる。DNAを構成性または誘導性プロモータ

一の制御下に置くことができる。誘導性の系の例には、病原体による誘導発現および化学物質による誘導が含まれる。こうして本発明蛋白質を適切な微生物または培養細胞内で産生させ、使用のために抽出および単離することができる。適切な微生物には、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) および酵母が含まれる。適切な細胞には、培養さ

れた昆虫細胞および培養された哺乳動物細胞が含まれる。遺伝子材料をウイルスまたはバクテリオファージ内へクローニングすることもできる。前記DNAを既知の方法でいずれかの植物種内へ形質転換し、これにより抗微生物性蛋白質をその植物内で発現させることもできる。

本発明によれば植物細胞を、本発明による構造体を用いて多様な既知の方法で形質転換することができる (アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) Tiプラスミド、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクトイル銃 (microprojectile gun) など)。形質転換された細胞は、適切な場合には次いで新規な核物質がゲノム内に安定に取り込まれた全植物を再生しうる。この方法で、形質転換された単子葉植物および双子葉植物の両方を得ることができ、通常は後者の方が再生しやすい。

調製しうる遺伝子修飾された植物の例には、家畜用穀物 (field crop)、穀類 (cereal)、果実および野菜、たとえば下記のものが含まれる。カナダ (canola)、ヒマワリ、タバコ、サトウダイコン、ワタ、ダイズ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、コメ、モロコシ、トマト、マンゴー、モモ、リンゴ、ナシ、イチゴ、バナナ、メロン、バレイショ、ニンジン、レタス、キャベツ、タマネギ。

本発明は図面を参照することによってさらに理解しうる：

図1は、Ca-AMP1の精製に関するカチオン交換クロマトグラム、およびこれと共に抗真菌活性のグラフを示す。

図2は、精製されたCa-AMP1のHPLCプロファイルを示す。

図3は、Ca-AMP1のSDS-PAGE分析を示す。

図4は、Ca-AMP1のアミノ酸配列を示す。

図5は、Bm-AMP1、Ca-AMP1、Ac-AMP2、および多数のキチン結合性レクチンのアミノ酸配列の一致を示す。

図6は、蛋白質Ca-AMP1に関して可能性のある推定DNA配列の1つを示す。

図7は、Ca-AMP1、およびヒュ蛋白質Ac-AMP1と共にインキュベートされた、部分的に阻害されたフザリウム・カルモラム胞子を示す。

図8は、キチンを用いたCa-AMP1のアフィニティークロマトグラフィー処理の種々の画分のSDS-PAGE分析を示す。

図9は、Bm-AMP1の精製に関するカチオン交換クロマトグラム、およびこれと共に抗真菌活性のグラフを示す。

図10は、精製されたBm-AMP1のHPLCプロファイルを示す。

図11は、Bm-AMP1のアミノ酸配列を示す。

図12は、Bm-AMP1に関して可能性のある推定DNA配列の1つを示す。

以下の実施例は本発明を説明するものである。

#### 実施例1

##### 抗真菌活性および抗菌活性のアッセイ

抗真菌活性は先に報告された顕微分光分析により測定された（ブレケルト（Broekaert），1990，FEMS Microbiol Lett，69：55-60）。試験はルーティンに20 $\mu$ lの（フィルター滅菌した）被験溶液および80 $\mu$ lの真菌胞子（ $2 \times 10^4$  胞子/ml）を用いて、半濃度バレイショデキストロースブロス（培地A）、またはそれぞれ最終濃度1mMおよび50mMとなるように添加されたCaCl<sub>2</sub>およびKClを含有する半濃度バレイショデキストロースブロス（培地B）中で実施された。

特に指示しない限り試験生物はフザリウム・カルモラム（菌株IMI 180420）であり、インキュベーションは25℃で48時間行われた。増殖阻止率%は、595nmにおける対照微生物培養物の補正済み吸光度に対する、対照微生物培養物の補正済み吸光度から試験微生物培養物の補正済み吸光度を差し引き

たものの比率の、100倍と定義される。補正済み吸光度値は、48時間後に測定された595nmにおける吸光度から30分後に測定された595nmにおける吸光度を差し引いたものに等しい。

抗菌活性は下記に従って顕微分光分析により測定された。細菌懸濁液はソフト栄養寒天（トリプトン、10g/l；シーブラーク（Seaplaque）（FMC），5g/l）に接種することにより調製された。細菌懸濁液（ $10^5$ コロニー形成単位/ml）のアリコート（80 $\mu$ l）を、平底96ウェルマイクロプレート内のフィルター滅菌試料（20 $\mu$ l）に添加した。595nmにおける培養

物の吸光度を、28℃でのインキュベーションの30分後および24時間後に、マイクロプレート読み取り装置により測定した。増殖阻止率%は抗真菌活性アッセイにつき前記に述べたように計算された。

## 実施例2

トウガラシまたはコバンソウの種子からの塩基性蛋白質の抽出

1kgのトウガラシまたはコバンソウの種子（チルターン・シーズから、英国カンブリア）をコーヒーマイルで粉砕し、得られた粉を4℃で2時間、10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、15mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、100mM  $\text{KCl}$ 、2mM  $\text{EDTA}$  および1mMベンズアミジンを含有する氷冷された抽出用緩衝液2リットルで抽出した。得られたホモジネートをガーゼで絞り、遠心分離（7,000 $\times g$ で30分間）により澄清化した。固体硫酸アンモニアを上清に添加して、75%相対飽和度となし、4℃で一夜放置することにより沈殿を生成させた。7,000 $\times g$ で30分間の遠心分離後に、沈殿を最小容量の蒸留水に再溶解し、ベンゾイル化セルロースチューブ（シグマ、ミズーリ州セントルイス）を用いて蒸留水に対して徹底的に透析した。透析後に、10倍濃度の緩衝液を添加することにより溶液を50mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ （pH9）に調整し、50mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ （pH9）中で平衡化したQ-セファローズ高速流（Q-Sepharose Fast Flow）（ファルマシア、スウェーデン国ウプサラ）カラム（12 $\times$ 5cm）に導通した。カラムを通過した蛋白質画分を酢酸でpH6に調整した。

この物質は前記種子の塩基性（pI > 9）蛋白質画分である。これらの画分を

さらに実施例3の記載に従って精製した。

### 実施例3

トウガラシまたはコバンソウの種子からの抗微生物性蛋白質の精製

トウガラシまたはコバンソウの抗微生物性蛋白質の単離に用いた出発原料は、実施例2に従って成熟種子から抽出された塩基性蛋白質画分であった。これらの蛋白質をこの抽出物のカチオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製した。

約500mlの塩基性蛋白質画分を50mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (pH9) に調整し、50mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (pH9) 中で平衡化したS-セファローズ高性能 (Q-Sepharose High Performance) (ファルマシア) カ

ラム (10×1.6cm) に付与した。カラムを3.0ml/分で、50-750mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (pH6.0) の直線濃度勾配を用いて325分間にわたって溶離した。溶出液を280nmにおける吸光度のオンライン測定により蛋白質につき監視し (トウガラシまたはコバンソウについての結果を、それぞれ図1および9の下側パネルに示す)、10mlの画分で採集した。それぞれ画分からの試料を実施例1の記載に従って抗真菌活性につきアッセイした (トウガラシまたはコバンソウについての結果を、それぞれ図1および9の上側パネルに示す)。

クロマトグラフィー処理後に、トウガラシ抽出物は220mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  付近で溶出する幅広い活性ピークを与えた。コバンソウ抽出物は250mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  付近で溶出する幅広い活性ピークを与えた。抗真菌活性を示すこれらの画分をプールし、逆相HPLCによりさらに精製した。そのピークの約3mg量を、0.1%TFA (トリフルオロ酢酸) で平衡化したPEP-S (多孔質シリカC<sub>2</sub>/C<sub>18</sub>、ファルマシア) カラム (25×0.4cm) に装填した。カラムを1ml/分で、0.1%TFAから100%アセトニトリル/0.1%TFAまでの直線濃度勾配を用いて100分間にわたって溶離した。溶出液を280nmにおける吸光度のオンライン測定により蛋白質につき監視した (トウガラシまたはコバンソウについての結果を、それぞれ図2および10の下側パネルに示す)。1mlの画分を採集し、真空乾燥し、1mlの蒸留水に再溶解し、そのうち10



$\mu$ 1を抗真菌アッセイに用いた（トウガラシまたはコバンソウについての結果を、それぞれ図2および10の上側パネルに示す）。上分に分離した単一の活性ピークを、それぞれCa-AMP1およびBm-AMP1と呼んだ。

#### 実施例4

##### 精製した抗微生物性蛋白質Ca-AMP1の分子構造

精製した抗微生物性蛋白質の分子構造をさらに分析した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を市販のプレキャストゲル（高密度ファストゲル（PhastGel High Density）、ファルマシアから）上で、ファストシステム（PhastSystem）ファルマシア）電気泳動装置を用いて実施した。試料用緩衝液は200mMトリス-HCl（pH8.3）、1%（w/v）SDS、mM EDTA、0.005%ブ

ロモフェノールブルー、および特に指示しない限り1%（w/v）ジチオトレイトール（DTE）を含有していた。電気泳動後に蛋白質を12.5%グルタルアルデヒド中で固定し、ホイケスホーベンおよびデルニック（Heukeshoven, Dernick）（1985, Electrophoresis, 6, 103-112）に従って銀染色した。比較のために分子量マーカー（ファルマシア）を走行させた（図3、列M）：17kDa、14.5kDa、8kDa、6kDa、2.5kDa。

Ca-AMP1をSDS-PAGEにより分析した。Ca-AMP1は $\beta$ -メルカプトエタノールで還元したのち、見掛け分子量4-5kDaの単一バンドとして走行する（図3、列2および4）。未還元Ca-AMP1は14kDaの単一バンドとして走行する（図3、列1および3）。これらの結果は、天然Ca-AMP1はオリゴマー（恐らく二量体）蛋白質であることを示す。

#### 実施例5

##### Ca-AMP1およびBm-AMP1のアミノ酸配列

フルマー（Fullmer）（1984, Anal Biochem, 142, 336-341）の方法を用いるS-ピリジルエチル化によりシステイン残基

を修飾した。P e p - S (多孔質シリカC<sub>2</sub>/C<sub>18</sub>) (ファルマシア) カラム (25×0.4 cm) 上でのHPLCにより試薬を除去した。カラムを0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) から0.1%TFA含有アセトニトリルまでの直線濃度勾配を用いて溶離することにより、S-ピリジルエチル化蛋白質を採集した。得られた蛋白質画分を、120Aアナライザー (アプライド・バイオシステムズ) によるフェニルチオヒダントインアミノ酸誘導体のオンライン検出を伴う477A蛋白質シーケンサー (アプライド・バイオシステムズ) により、アミノ酸配列分析した。

C a -AMP 1の配列を決定する最初の試みにより、この蛋白質はN-末端ブロックされていることが示された。次いでS-ピリジルエチル化蛋白質を供給業者 (ベーリンガー・マンハイム、FRG) の指示に従ってピログルタメートアミノペプチダーゼで脱ブロックした。この反応は部分的に成功して、最初の16アミノ酸に関する配列が求められたにすぎない。

C-末端に関する配列を求めるために、C a -AMP 1をトリプシンで消化し、得られた3つのフラグメントを配列決定した。1つはブロックされていることが認められ、これはN-末端である。他の2つのペプチドの配列決定により、それらをN-末端に関する配列と整列させることができ (図4)、かつその完全配列はキチン結合性植物蛋白質中に見られたシステイン/グリシンに富むドメインと相同性であることが示された (図5)。C a -AMP 1に関するこの配列が不完全であって、C-末端にさらにアミノ酸があるという可能性はある。このペプチドがN-末端ブロックされており、これをアミノペプチダーゼで除去するという所見は、N-末端アミノ酸がグルタミンであることを示唆する。

B m -AMP 1のアミノ酸配列を図11に示す。配列中の2つの位置において2アミノ酸の選択の可能性がある。位置9においてアミノ酸はアルギニン (R) またはヒスチジン (H) であり、位置23においてアミノ酸はセリン (S) またはアスパラギン (N) である。精製された蛋白質画分B m -AMP 1は、これら2位置において前記アミノ酸のいずれかの組み合わせをもつ異なる配列のペプチドの混合物である可能性がある。

図5は、タバコキチナーゼ（シンシ (Shinshi) ら, 1987, Pro Nat Aca Sci USA, 84:89-93)、マメキチナーゼ（ブローグリー (Broglie) ら, 1986, Pro Nat Aca Sci USA, 83:6820-6824)、ヘベイン（ブレケルト (Broekaert) ら, 1990, Pro Nat Aca Sci USA, 87:7633-7637)、コムギレクチン（レイケルおよびニルキンス (Raikhel, Nilkins), 1987, Pro Nat Aca Sci USA, 84:6745-6749)、イラクサレクチン（チャポー (Chapot) ら, 1986, FEBS Lett, 195:231-234)、Ca-AMP2（ブレケルト (Broekaert) ら, 1992, Biochemistry, 31:4308-4314; 国際特許出願公開WO92/21699号明細書）からのN-末端アミノ酸配列、ならびにCa-AMP1およびBm-AMP1に関する配列の一致を示す。配列の一致および保存変化を囲んだ。保存変化はアミノ酸相同群FWY、MILV、RKH、ED、NQ、STおよびPAG内での置換である。

ると考えられる。一致を最大にした場合に生じるギャップをダッシュで示す。

Ca-AMP1およびBm-AMP1に関するアミノ酸配列は、キチン結合性植物蛋白質中のシステイン/グリシンに富むドメインに対して著しい類似性を示す。特にCa-AMP1はヘベインに65%等しい。Bm-AMP1はヘベインに35%、Ca-AMP1に45%等しい。ヒユ蛋白質類と同様に、Ca-AMP1およびBm-AMP1はヘベインより実質的に塩基性が高い。

Ca-AMP1およびヘベインは両方とも4個の塩基性アミノ酸を含むが、Ca-AMP1はヘベインの5個に対し1個の酸性アミノ酸を含むにすぎない。それらの活性にとってこれらの蛋白質の全体としての塩基性が重要であれば、ヘベインの位置28のアスパラギン酸を、Ca-AMP1のこの位置に見られるアルギニンに交換すると、ヘベインの比活性が高まると期待される。事実、Ca-AMP1とヘベインはサイズおよびアミノ酸配列において極めて類似するが、それらの活性の水準およびスペクトルは著しく異なるというのは、極めて注目に値す

と思われる。

Bm-AMP 1は、6個の塩基性アミノ酸およびわずか2個の酸性アミノ酸を含み、これに対しヘベインは4個の塩基性アミノ酸を含むが、5個の酸性アミノ酸を含む。従ってBm-AMP 1の全体として塩基性のプロファイルが、ヘベインおよび他のキチン結合性植物蛋白質と比較してこの蛋白質の抗真菌活性が向上していることに関係すると思われる。

図6および12は、それぞれCa-AMP 1およびBm-AMP 1をコードする遺伝子の可能なDNA配列の1つを示す。この遺伝子配列は、分かったアミノ酸配列から、双子葉植物に一般的に生じるコドンを用いて推定された。トウガラシおよびコバンソウの実際の遺伝子配列は、遺伝子コドンの縮重のため、異なる可能性がある。

#### 実施例6

##### 本発明蛋白質の抗真菌活性の安定性

抗真菌活性に関する試験は、実施例1に挙げたアッセイ法に従って、フザリウム・カルモラム胞子を含む増殖培地で5倍希釈された20  $\mu$  lの試料を用いて行われた。未処理対照試料は、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) 中

の被験蛋白質500  $\mu$  g/mlからなっていた。熱安定性試験は、アリコートの被験蛋白質を100℃までの種々の温度で10分間加熱することにより行われた。ジスルフィド橋の還元は、30 mMのジチオトレイトールおよび300 mMのトリス-HCl (pH 8.6) を添加することにより行われた。逆相クロマトグラフィーにより試薬を除去した。消化のために種々のプロテアーゼを200  $\mu$  g/mlで添加し、37℃で3時間インキュベートした。試薬のみを含む対照処理は、逆相クロマトグラフィー段階後に抗真菌活性につき陰性であることが証明された。

精製されたCa-AMP 1蛋白質およびBm-AMP 1蛋白質の抗真菌活性は、最高80℃で10分間の熱処理に対して抵抗性であった。しかしジチオトレイトールによるジスルフィド結合の還元は、抗真菌活性を完全に失わせた。これらのジスルフィド結合は生物学的活性にとって必須なのである。

プロテイナーゼKまたはプロナーゼEによるCa-AMP 1の処理は抗真菌活性を少なくとも10倍低下させたのに対し、トリプシンはこの活性をわずか2倍低下させ、キモトリプシンは活性に対して影響を及ぼさなかった。

#### 実施例7

#### 本発明蛋白質の抗真菌効力

##### (A) Ca-AMP 1

精製された蛋白質の抗真菌効力を、実施例1に記載したアッセイ法を用いて種々の植物病原性真菌につき評価した。真菌の増殖、真菌胞子の採集および収集、ならびに関糸体フラグメントの調製は、先に報告されたものに従って行われた (ブレケルト (Broekaert) ら, 1990, FEMS Microbiol Lett, 69: 55-60)。下記の真菌株を用いた: アルテルナリア・ブラシオコラ (Alternaria brassicola) MUCL 20297、アスコシタ・ピシ (Ascochyta pisi) MUCL 30164、ボツリチス・シネレア (Botrytis cinerea) MUCL 30158、セルコスボラ・ベチコラ (Cercospora beticola) K897、コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum) MUCL 9577、フザリウム・カルモ

ラムIMI 180420、フザリウム・オキシスポラム f. sp. ピシ (Fusarium oxysporum f. sp. pisi) IMI 236441、フザリウム・オキシスポラム f. sp. リコペルシシ (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici) MUCL 909、ネクトリア・ヘマトコッカ (Nectria haematococca) コレクション・ファン・エッテン160-2-2、ペニシリウム・ジギテイタム (Penicillium digitatum) (K0879)、フォマ・ベタ (Phoma betae) MUCL 9916、ピレノフォラ・トリティシーレペンチス (Pyrenophora tritici-repentis) MUCL 30217、ピリキュラリア・オリゼ (Piricularia oryzae) MUCL 30166、リゾクトニア・ソラニ (Rhizoctonia

solanii) CBS 207-84、セプトリア・トリティシ (Septoria tritici) (K1097D)、トリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride) (K1127)、ベルティシリウム・アルボアトラム (Verticillium albo-atrum) (K0937)、ベルティシリウム・ダーリア (Verticillium dahliae) MUCL 19210。

リゾクトニア・ソラニについては菌糸体フラグメントを接種物として用い、これに対し他のすべての真菌は孢子として接種された。

増殖培地Aまたは培地Bを用いて、抗真菌性蛋白質の系列希釈液を真菌に付与した。増殖阻止率%を顕微分光分析法により測定した。48時間のインキュベーション後に50%の増殖阻止に要する濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を用量-反応曲線から計算した。

結果を表1にまとめる。

表 1

真菌	I C <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	
	培地A	培地B
アルテルナリア・ブラシオコラ	20	>500
アスコシタ・ピシ	3	>500
ボツリチス・シネレア	2	>500
セルコスボラ・ベチコラ	3	200
コレトリカム・リンデムチアナム	50	>500
フザリウム・カルモラム	4	>500
フザリウム・オキシスポラム・ピシ	>500	>500
フザリウム・オキシスポラム・リコベルシシ	300	>500
ネクトリア・ヘマトコッカ	4	>500
ペニシリウム・ジギテイタム	10	>500
フォマ・ベタ	300	>500
ピレノフォラ・トリティシーレペンチス	70	>500
ピリキュラリア・オリゼ	5	>500
リゾクトニア・ソラニ	8	>500
セプトリア・トリティシ	1.5	400
トリコデルマ・ビリデ	200	>500
ベルティシリウム・アルボーアトラム	2	>500
ベルティシリウム・ダーリア	6	>500

一連の真菌につき培地Aにおいてアッセイしたところ、I C<sub>50</sub>値は1  $\mu$ g/ml から500  $\mu$ g/ml 以上にまで変動した。しかし18株中12株の病原性真菌についてはI C<sub>50</sub>値は50  $\mu$ g/ml 未満であり、10株の真菌についてはI C<sub>50</sub>値は10  $\mu$ g/ml 未満であった。これらの結果は、Ca-AMP1が有効かつ広域スペクトルの真菌増殖阻害物質であることを示す。

しかしCa-AMP1の活性はアッセイに採用されるイオン条件に対して著しく感受性であり、その活性は高い塩類（培地13）においては本質的に失われる。

Ca-AMP 1を用いて得られた抗真菌活性の水準は、先にヒユの種子から単離された2種類のペプチド (Ac-AMP類) (ブレケルト (Broekaert) ら, 1992, Biochemistry, 31:4308-4314) のものに匹敵する。キチン結合性植物蛋白質、たとえばヘベインまたはイラクサレクチンと比較して、Ca-AMP 1ははるかに高い比活性をもつ。先に本発明者らは、イラクサレクチンが100  $\mu$ g/ml未満の濃度で試験した7株中3株の真菌のみを阻害し、20  $\mu$ g/ml未満では阻害しないことを示した (ブレケルト (Broekaert) ら, 1992, Biochemistry, 31:4308-4314)。またヘベインはイラクサレクチンよりはるかに活性が低いとすら報告されている (ファン・パリス (Van Parijs) ら, 1991, Planta, 183:258-264)。従ってアミノ酸配列の類似性にもかかわらず、Ca-AMP 1はヒユ蛋白質と同様に、キチン結合性植物蛋白質とは別個に分類しうる。

Ca-AMP 1およびヒユ蛋白質は、部分的に阻害された真菌胞子において同じ形態学的変化をもたらす。これは、アッセイにフザリウム・カルモラム胞子を IC<sub>50</sub> 値より2-4倍低い蛋白質濃度において使用した場合、容易に見ることができる。光学顕微鏡下で観察すると、これらの蛋白質は発芽中の分節菌体を著しく分枝させる (図7)。図7Aは24℃で8時間発芽させた対照胞子を示す；図7Bおよび7Cは、それぞれCa-AMP 1およびAc-AMP 1により部分的に阻害された胞子を示す。ヘベインは濃厚な分節閑体および芽を発現させることが報告されている (ファン・パリス (Van Parijs) ら, 1991, Planta, 183:258-264)。

#### (B) Bm-AMP 1

精製された蛋白質の抗真菌効力を、実施例1に記載したアッセイ法を用いて種々の植物病原性真菌につき評価した。真菌の増殖、真菌胞子の採集および収集、ならびに菌糸体フラグメントの調製は、先に報告されたものに従って行われた (ブレケルト (Broekaert) ら, 1990, FEMS Microbiol. Lett, 69:55-60)。下記の真菌株を用いた：アルテルナリア・ロンギペス (Alternaria longipes) 株CBS 620.8



3、ボツリチス・シネレアMUC L 30158、クラドスポリウム・スフェロスperlマム (Cladosporium sphaerospermum) 株K0791、フザリウム・カルモラムIMI 180420、ペニシリウム・ジギテイタム株K0879、セプトリア・トリティシ (K1097D)、トリコデルマ・ビリデ (K1127)、ベルティシリウム・ダーリアMUC L 19210

。

すべての真菌を孢子として接種した。

増殖培地Aまたは培地Bを用いて、抗真菌性蛋白質の系列希釈液を真菌に付与した。増殖阻止率%を顕微分光分析法により測定した。48時間のインキュベーション後に50%の増殖阻止に要する濃度 (IC<sub>50</sub>値) を用量-反応曲線から計算した。

Bm-AMP 1についての結果を表2にまとめる。

表2

真菌	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	培地A	培地B
アルテルナリア・ロンギペス	2	>500
ボツリチス・シネレア	9	>500
クラドスポリウム・スフェロスperlマム	3	>500
フザリウム・カルモラム	9	>500
ペニシリウム・ジギテイタム	6	>500
セプトリア・トリティシ	1	400
トリコデルマ・ビリデ	150	>500
ベルティシリウム・ダーリア	10	>500

一連の真菌につき培地Aにおいてアッセイしたところ、IC<sub>50</sub>値は1 μg/ml から150 μg/ml にまで変動した。しかし8株中6種の病原性真菌についてはIC<sub>50</sub>値は10 μg/ml 未満であった。これらの結果は、Bm-AMP 1が有効かつ広域スペクトルの真菌増殖阻害物質であることを示す。

しかしBm-AMP 1の活性はアッセイに採用されるイオン条件に対して著し

く感受性であり、その活性は高い塩類（培地B）においては本質的に失われる。

Bm-AMP 1を用いて得られた抗真菌活性の水準は、Ca-AMP 1のもの、および先にヒユの種子から単離された2種類のペプチドのもの（Ac-AMP 類）に匹敵する。キチン結合性植物蛋白質、たとえばヘベインまたはイラクサレクチンと比較して、Bm-AMP 1ははるかに高い比活性をもつ。先に本発明者らは、イラクサレクチンが $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度で試験した7株中3株の真菌のみを阻害し、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満では阻害しないことを示した（ブレケルト（Broekaert）ら、1992, Biochemistry, 31: 4308-4314）。またヘベインはイラクサレクチンよりはるかに活性が低いとすら報告されている（ファン・パリズ（Van Parijs）ら、1991, Planta, 183: 258-264）。従ってアミノ酸配列の類似性にもかかわらず、Bm-AMP 1はCa-AMP 1およびヒユ蛋白質と同様に、キチン結合性植物蛋白質とは別個に分類しうる。

### 実施例8

#### Ca-AMP 1のキチン結合活性

Ca-AMP 1とキチン結合性植物レクチンの配列の類似性により、Ca-AMP 1もキチンに結合する可能性があることが示唆された。

マイクロキチン-カラムにCa-AMP 1を装填し、カラムを $50\text{mM}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$ （ $\text{pH}7.0$ ）で洗浄した。 $50\mu\text{g}$ のCa-AMP 1をカラム（ $0.5\times 1\text{cm}$ ）に装填し、溶出液をカラムに3回再循環した。最終溶出液を採集した。カラムを $1\text{ml}$ の $50\text{mM}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$ （ $\text{pH}7.0$ ）で5回洗浄し、この画分を採集した。最後にカラムを $1\text{ml}$ の $100\text{mM}$ 酢酸（ $\text{pH}2.8$ ）で5回洗浄し、この酸洗浄画分を採集した。採集した画分を脱塩し、逆相クロマトグラフィーにより濃縮し、最後にSDS-PAGE分析のための試料用緩衝液 $50\mu\text{l}$ に溶解した。

図8はこの分析の結果を示す。列Mは $29\text{kDa}$ 、 $20.1\text{kDa}$ 、 $13.2\text{kDa}$ および $5\text{kDa}$ のサイズの分子量マーカーを示す。列1は、対照としての還元Ca-AMP 1の走行である。列2は、反復 $50\text{mM}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$ （ $\text{pH}7$

0) 洗浄により溶出した画分である。列3は酸洗浄画分、列4は初期貫流物である。大部分の蛋白質がカラムに結合し、低pHの脱着用緩衝液中に溶出したことが分かる。これは、Ca-AMP1がキチンに対して親和性を示すことを示唆する。

### 実施例9

#### Ca-AMP1およびBm-AMP1の抗菌活性および抗酵母活性

精製した蛋白質を下記の細菌：巨大菌 (*Bacillus megaterium*) ATCC 13632、大腸菌株HB101、およびシュートモナス・アエウロゲナーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) NCIB 8295の増殖に対して及ぼす影響につき評価し；またビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) JRY188の増殖に及ぼす影響を評価した。バイオアッセイは実施例1の記載に従って実施された。結果を表3にまとめる。Ca-AMP1およびBm-AMP1は、それぞれ巨大菌およびビール酵母の増殖を強く阻害したが、試験した2種類のグラム陰性細菌に対してはほとんど、または全く影響を与えなかった。

表3

細菌および酵母に対するCa-AMP1およびBm-AMP1の活性

	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	Ca-AMP1	Bm-AMP1
巨大菌	20	10
シュートモナス・アエウロゲナーサ	500	500
大腸菌	>800	>800
ビール酵母	30	15

### 実施例10

#### Ca-AMP1およびBm-AMP1 cDNAの分子クローニング

野生の植物から6つの異なる生育段階の種子を採集し、液体窒素中で凍結し、-80℃に保存する。粉碎したのち、6つの異なる生育段階の混合物15gから

デブリース (De Vries) ら (1988, Plant Molecular Biology Manual, B6, 1-13) の方法により全RNAを抽出する。ただし組織のg当たり、6mlの1:2フェノール:RNA抽出用緩衝液混合物、および2mlのクロロホルムを用いる。シルフロー (Silflow) ら (1979, Biochemistry 18, 2725-2731) の記載に従って、オリゴ(dT)-セルロース上でのアフィニティークロマトグラフィーによりポリ(A)+mRNAを精製する。ガブラーおよびホフマン (Gubler, Hoffman) (1983, Gene 25, 263-269) に従って1.5  $\mu$ gのポリ(A)+mRNAから二本鎖cDNAを調製し、ファルマシアのcDNA合成キットを用いてEcoRI/NotIアダプターにリゲートする。

これらのcDNAを製造業者の指示に従ってラムダZAPIIファージベクター (ステラタジーン) 内へクローニングする。cDNAライブラリーをスクリーニングするためのDNAプローブはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により下記に従って調製される。Ca-AMP1またはBm-AMP1のアミノ酸の走行に

対応する2種類のディジェネレート (degenerate) オリゴヌクレオチドを合成する: 一方はセンス配向を有し、他方はアンチセンス配向を有する。両方のプライマーとも、それらの5'末端にAAAGAATTC (すなわちEcoRI認識配列に続くAAA) 配列をもつ。PCRは、Taqポリメラーゼを使用し、標準的条件下で (サムブルック (Sambrook) ら, Molecular Cloning, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス)、アンプライマー (amp1imer) としてのオリゴヌクレオチド、および標的DNAとしての25ngのcDNAを用いて実施される。温度プログラムには、94℃で5分間の初期段階、30サイクル (94℃で1分間; 45℃で2分間; 72℃で3分間)、および72℃で10分間の初期段階が含まれる。PCR増幅生成物を3%アガロース (ヌシーブ (NuSieve)、FMC) ゲル上で精製する。ディジェネレートオリゴヌクレオチドを用いて、このPCR生成物を部分的に再増幅する。このPCR増幅生成物を再度3%アガロース (ヌシーブ、F

MC) ゲル上で精製し、同一条件下でのPCRにより再増幅する。ただし反応混合物は $130\mu\text{M}$ のd T T Pおよび $70\mu\text{M}$ のジゴキシゲニン-11-d U T Pを $200\mu\text{M}$ のd T T Pの代わりに含有する。ジゴキシゲニン標識PCR増幅生成物を再度3%ヌシーブアカロースゲル上で精製する。約10,000プラーク形成単位のラムダZAPII cDNAライブラリーを、ジゴキシゲニン標識PCR増幅生成物により、ナイロン膜(ハイボンド-N (Hybond-N)、アメルシャム)を用いるin situプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングする。膜を風乾し、DNAを紫外線( $0.15\text{J./cm}^2$ )下で膜に架橋させる。ハイブリダイゼーションは $64^\circ\text{C}$ で16時間、 $10\text{ng/m}$ 1の熱変性ジゴキシゲニン標識プローブを含有する $5\times\text{SSC}$ 、1%ブロッキング試薬(ベーリンガー・マンハイム)、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%ドデシル硫酸ナトリウム中において実施される。非特異的に結合したプローブは、 $2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ 中 $25^\circ\text{C}$ において5分間で2回、 $0.1\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ 中 $60^\circ\text{C}$ において15分間で2回、すすぐことにより除去しうる。プローブの検出は、アルカリホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体(ベーリンガー・マンハイム)およびその基質5-ブromo-4-クロロー

3-インドリルホスフェート(ベーリンガー・マンハイム)を用いて、製造業者の指示に従って行われる。陽性プラークを、同一プローブにより同一条件下でさらに2回のスクリーニング過程により精製する。精製プラークから挿入配列を切り取り、インビボでピーブルスクリプトファージミド(p Bluescript phagemid)形中へヘルパーファージR408により挿入する。種々の陽性クローンからの挿入配列をEcoRI消化により切り取り、それらのサイズをアガロースゲル電気泳動により比較する。幾つかのクローンをヌクレオチド配列分析する。最大挿入配列を有するクローンがCa-AMP1またはBm-AMP1に対応するオープンリーディングフレームを有する可能性があり、これは実験用N-末端アミノ酸配列との比較により判定しうる。全長cDNAクローンはそれらの5'および3'末端非翻訳領域ならびにポリアデニル化シグナルにおいて

互いに異なる可能性がある。

全長 cDNA を得るために、他の方法をとることができる。PCR を標準的条件下で、一方では M13 普遍プライマー、他方では M13 逆プライマーと組み合わせたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて実施する。このオリゴヌクレオチドの最後のヌクレオチドが、全長未満 (less than full length) cDNA クローンのポリ A テイルを直接にフランキングする 3' 側非翻訳領域の一部の逆相補配列を形成する。この配列を 5' 末端方向へ、前方にヌクレオチド 'ATA' を含む GAATTC EcoRI 認識部位によって延長する。鋳型としては 2  $\mu$ g の全 cDNA または  $10^5$  の組換えファージを用いる。両方の場合とも、3 回の別個の反応を設定する。増幅の前に、PCR 温度プログラムにおいて 99°C で 5 分間の初期段階によりファージを溶解して、ファージ DNA を放出させる。増幅生成物のサイズは 3% アガロース (ヌシーブ、FMC) ゲル上での電気泳動により決定される。異なる長さの挿入配列に対応するサイズの生成物が得られ、cDNA ライブラリー中に全長 cDNA が存在する場合にはこれらにそれが含まれる。

#### 実施例 11

##### 発現ベクターの構築

発現ベクターを構築する：これは、その 5' 末端においてカリフラワーモザイ

クウイルスの 35S RNA の強力な構成性プロモーター (オデル (Odel) ら, 1985, Nature 313, 810-812) によりフランキングされ、高い転写活性を得るための重複エンハンサー要素 (カイ (Kay) ら, 1987, Science 236, 1299-1302) を備えた、Ca-AMP1 または Bm-AMP1 DNA の全コード領域を含む。Ca-AMP1/Bm-AMP1 DNA の全コード領域は、その 3' 末端側においてはカリフラワーモサイクウイルスの 35S RNA のポリアデニル化配列 (CaMV355) によりフランキングされている。このベクターのプラスミド主鎖は、ファージミド pUC120 (ビエイラおよびメッシング (Vieira, Messing), 1987, Methods Enzymol. 153, 3-11) である。発

現ベクターは下記により構築される。Ca-AMP1/Bm-AMP1 DNAから構成されるcDNAクローンを、pEMBL18+（ベリンガー）のBamHI/SalI部位へクローニングする。このBamHI/SalIフラグメントを、予めBamHIおよびSalIで消化した発現ベクターpFAJ3002内へサブクローニングする。pFAJ3002は発現ベクターpFF19（チンメルマンズ（Timmermanns）ら、1990, J. Biotechnol. 14, 333-344）の誘導体であって、そのユニークEcoRI部位をHindIII部位で交換したものである。

### 実施例12

#### 植物形質転換ベクターの構築

実施例11で得た発現ベクターをHindIIIで消化し、Ca-AMP1/Bm-AMP1 DNA発現カセットを含むフラグメントをpBin19RiのユニークHindIII部位へサブクローニングする。pBin19Riは植物形質転換ベクターpBin19（ベバン（Bevan）, 1984, Nucleic Acids Research 12, 8711-8721）の修飾形であって、ユニークEcoRI部位とHindIII部位が交換され、欠陥ntpII発現カセット（イエノフスキー（Yenofsky）ら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3435-3439）が導入されたものである。

### 実施例13

#### 植物形質転換

攻撃力を失わせた（disarmed）アグロバクテリウム・チューメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）株LBA4404（pAL4404）（ヘケマ（Hoekema）ら、1983, Nature 303, 179-180）を、実施例12において調製したベクターによりデ・フラモンド（de Framond）ら（BioTechnology 1, 262-269）の方法で形質転換する。

タバコ（Nicotinia tabacum）サムサン（Samsun）の

葉のディスクを用いて、ホーシュ (Horsch) ら (1985, Science 227, 1229-1231) の方法、および pFRG8 を含むアグロバクテリウム属菌株との同時培養に基づいて、タバコの形質転換を行う。同時培養は  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンの選択負荷のもとで実施される。これらのトランスジェニック植物 (pFRG8 で形質転換) を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含有する培地上で再生させる。これらのトランスジェニック植物を新たに導入された遺伝子の発現につき、標準的なウェスタンブロット法により分析することができる。導入された遺伝子の構成性発現が可能な植物を選択し、自家受粉させて種子を得ることができる。トランスジェニック植物の F1 実生をさらに分析する。



【图1】

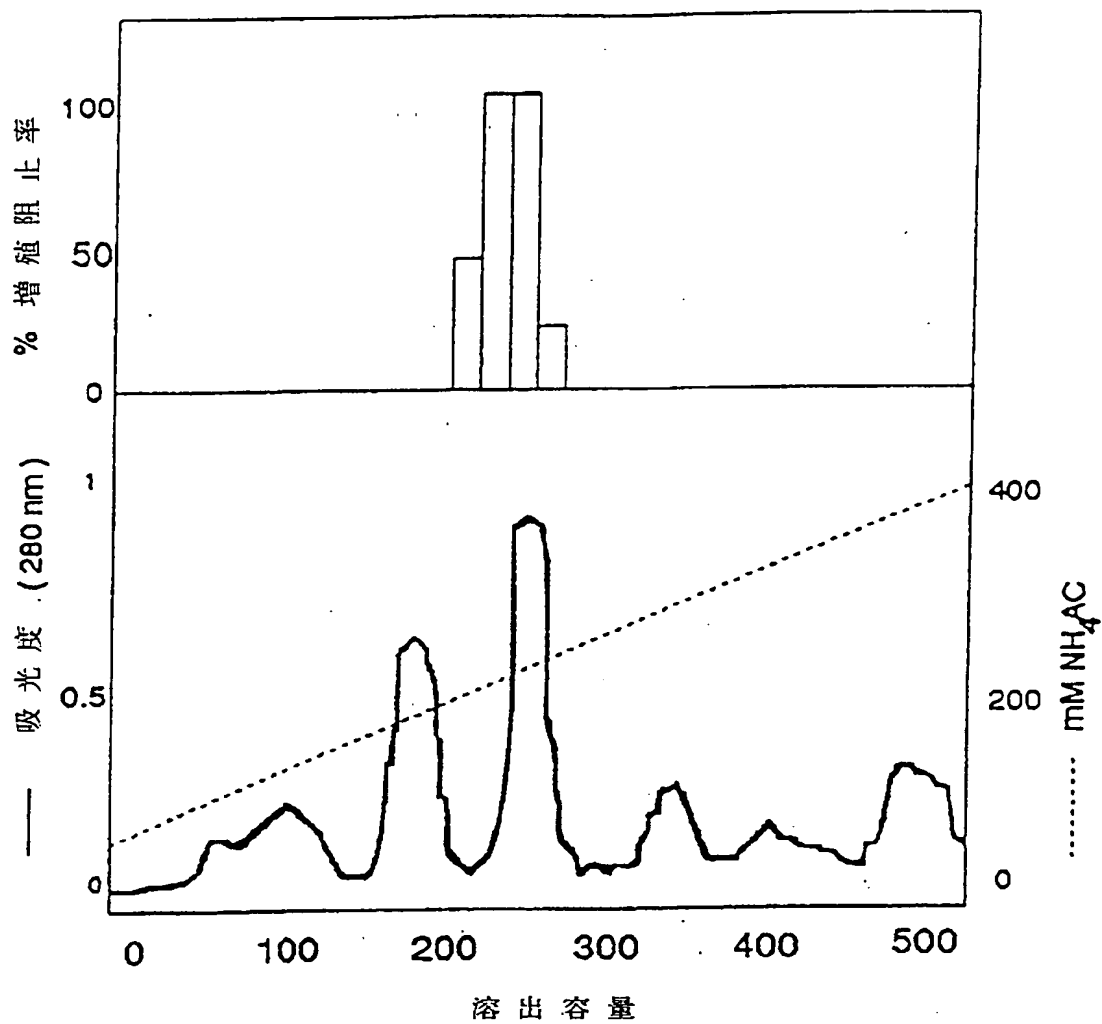


FIG.1

【図2】

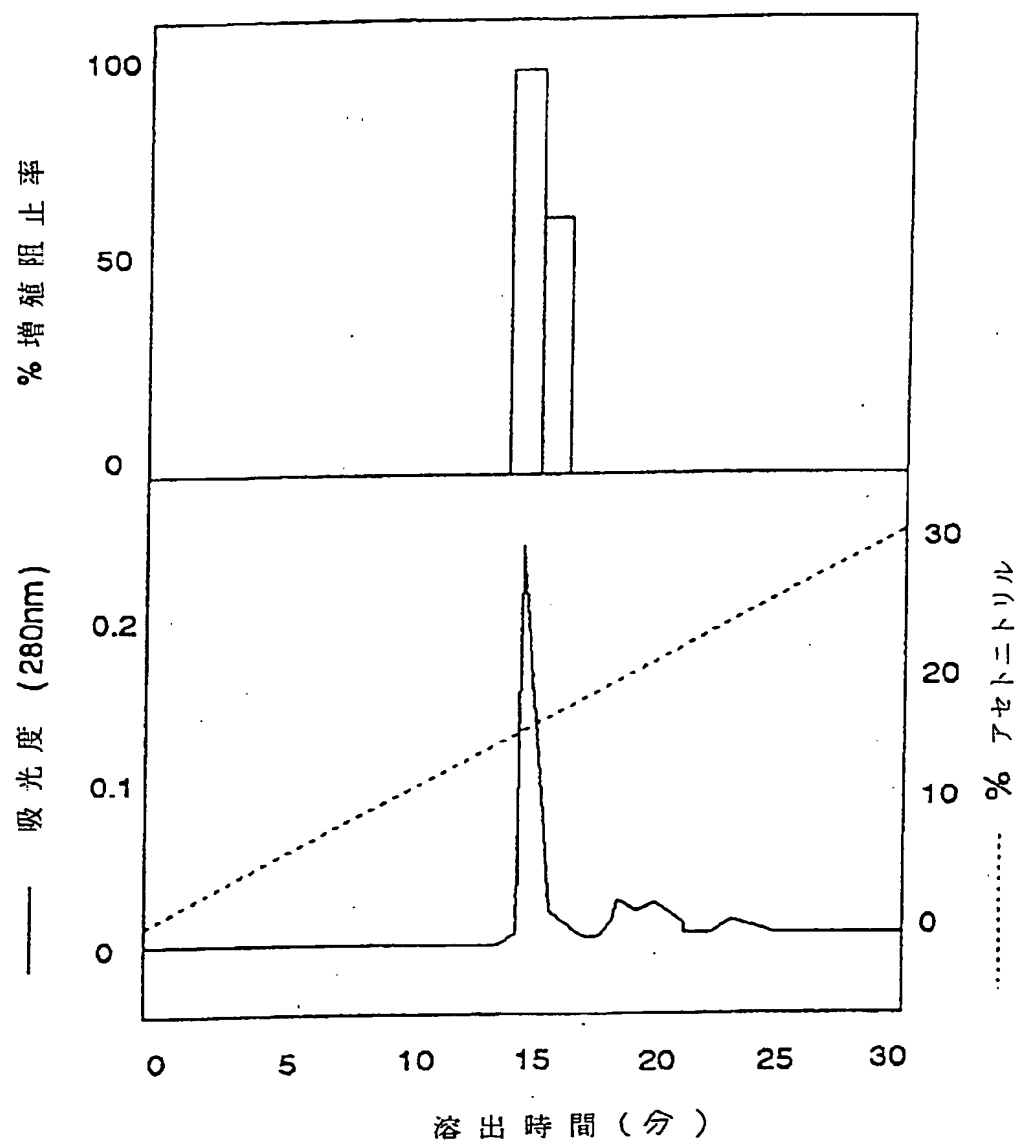
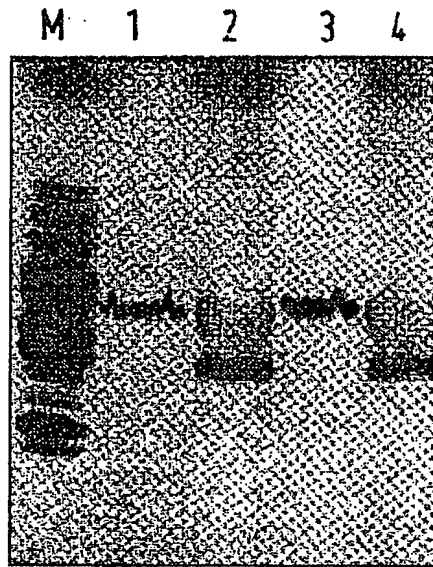


FIG.2

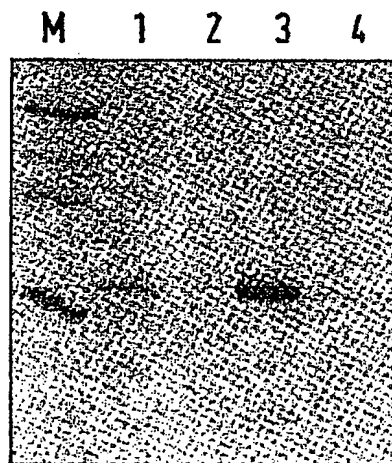
【図3】

FIG. 3



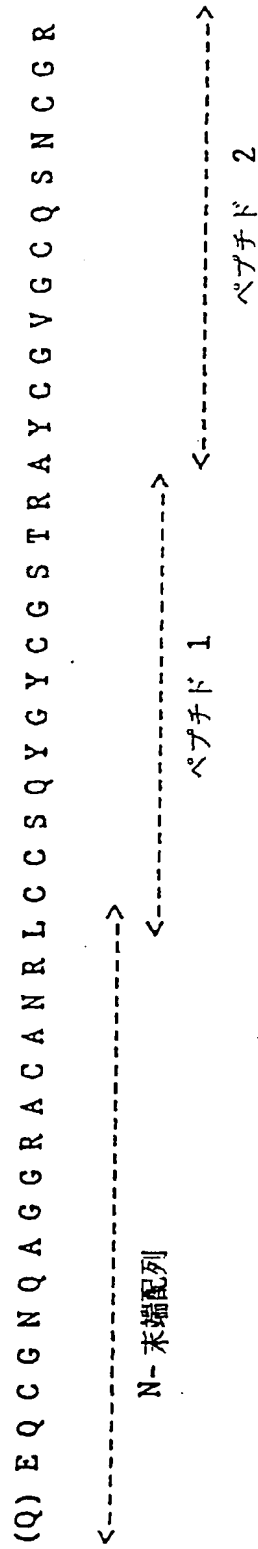
【図8】

FIG. 8



【図4】

FIG. 4



【図6】

## FIG.6

( CAA ) GAG CAA TGC GGA AAC CAA GCT GGA GGA AGA GCT TGC GCT AAC AGA CTT  
 TGC TGC TCT CAA TAC GGA TAC TGC GGA TCT ACT AGA GCT TAC TGC GGA GTT  
 GGA TGC CAA TCT AAC TGC GGA AGA

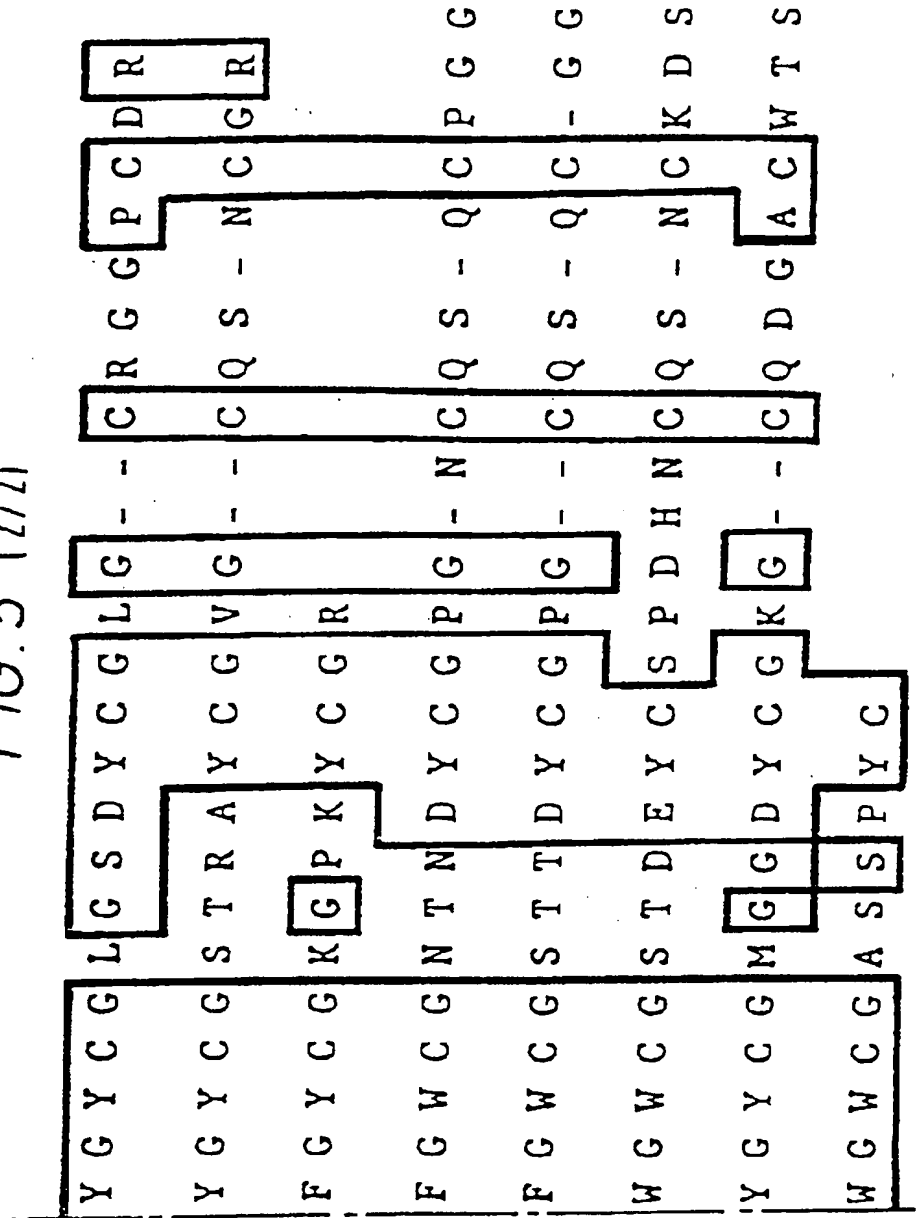
【図5】

FIG. 5 (1/2)

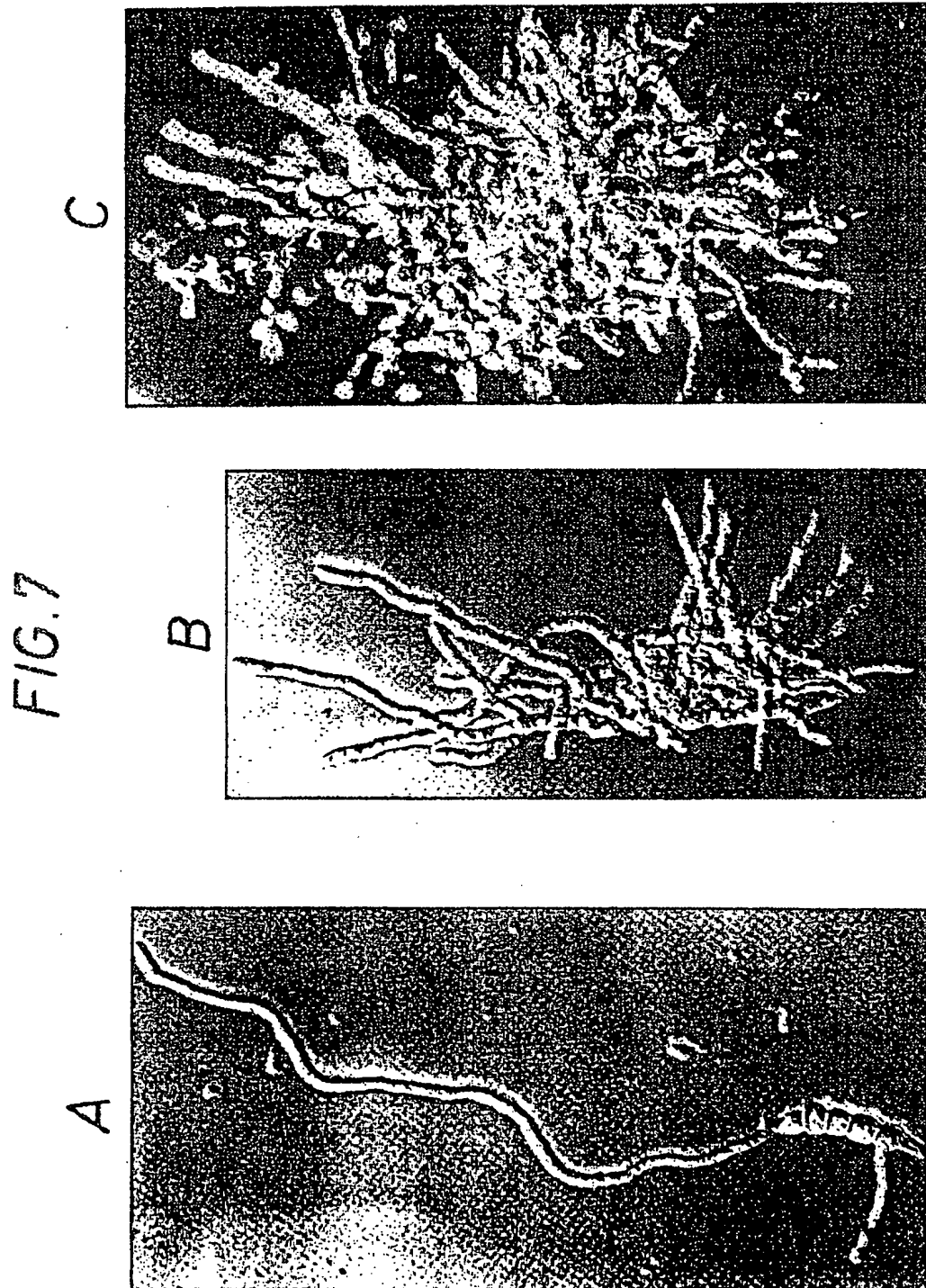
Bm-AMP1	C	S	S	-	-	-	H	N	P	C	P	R	H	Q	C	C	S	K			
Ca-AMP1	(Q)	E	Q	C	G	N	Q	A	G	R	A	C	A	N	R	L	C	C	S	Q	
AC-AMP2	V	G	E	C	V	R	-	-	G	R	-	C	P	S	G	M	C	C	S	Q	
クバコキチナーゼ	E	Q	C	C	G	S	Q	A	G	G	A	R	C	A	S	G	L	C	C	S	K
マメキチナーゼ	E	Q	C	C	G	R	Q	A	G	G	A	L	C	P	G	G	N	C	C	S	Q
ヘベイン	E	Q	C	C	G	R	Q	A	G	G	K	L	C	P	N	N	L	C	C	S	Q
コムギレクチン	Q	R	C	C	G	E	Q	G	S	N	N	E	C	P	N	N	L	C	C	S	Q
イラクサレクチン	Q	R	C	C	G	S	Q	G	G	G	G	T	C	P	A	L	R	C	C	S	I

【図5】

FIG. 5 (2/2)



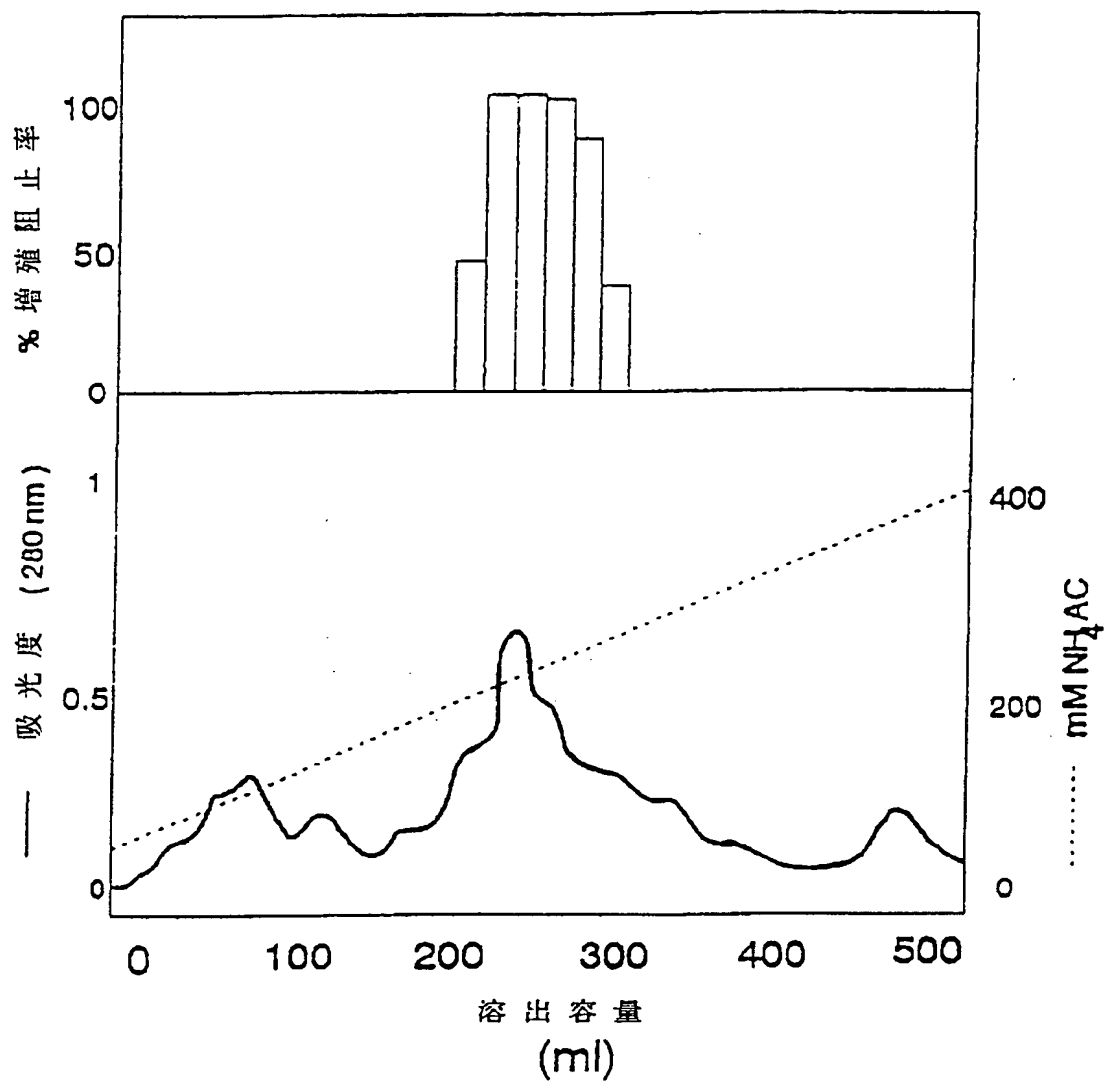
【図7】





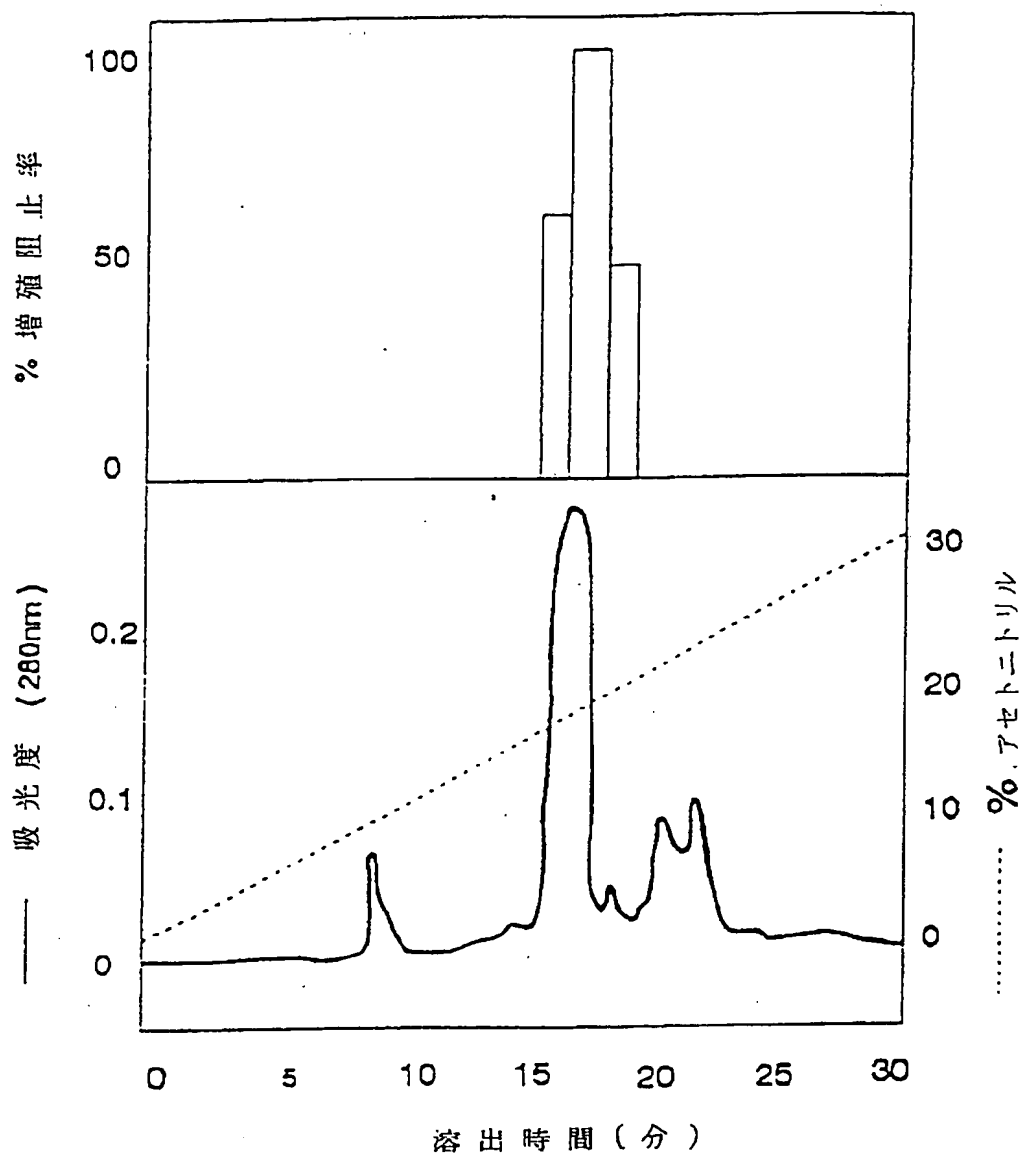
【图9】

FIG. 9



【図10】

FIG.10



【図11】

FIG. 11

Bm-AMP1 C S S H N P C P R H Q C C S K Y G Y C G L G S D Y C G L G C R G G P C D R  
<sub>H</sub> <sub>N</sub>

【図12】

*FIG.12*

TGC TCT TCT CAC AAC CCG TGC CCG AGA CAC CAA TGC TGC  
 TCT AAG TAC GGA TAC TGC GGA CTT GGA TCT GAC TAC TGC  
 GGA CTT GGA TGC AGA GGA GGA CCG TGC GAC AGA

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年10月24日

【補正内容】

請求の範囲の全文を以下のとおり差し替える。

請求の範囲

1. 実質的に図4または図11に示されるアミノ酸配列を有する抗微生物性蛋白質。
2. オリゴマーであり、かつ実質的に図4または図11に示されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドを含む、請求項1に記載の蛋白質。
3. 純粋な蛋白質Ca-AMP1である、請求項1に記載の蛋白質。
4. 純粋な蛋白質Bm-AMP1である、請求項1に記載の蛋白質。
5. 植物の種子から単離しうる、請求項1に記載の蛋白質。
6. トウガラシ属 (Capsicum) の種子、コバンソウ属 (Briza) の種子、カタボジウム属 (Catapodium) の種子、バプティシア属 (Baptisia) の種子、ミクロセンシス属 (Microsensis) の種子、ヒエンソウ属 (Delphinium) の種子よりなる群から選ばれる種子から単離しうる、請求項5に記載の蛋白質。
7. 合成によるものである、請求項1に記載の蛋白質。
8. 組換えDNAの発現により製造される、請求項1に記載の蛋白質。
9. 請求項1-8のいずれか1項に記載の蛋白質を含有する組成物。
10. 請求項1-6のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする、組換えDNA配列。
11. cDNAである、請求項10に記載のDNA配列。
12. ゲノムDNAである、請求項10に記載のDNA配列。
13. 植物ゲノムから単離された、請求項10に記載のDNA配列。
14. プロモーター配列を含む、請求項13に記載のDNA配列。
15. 請求項1-6のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子から得られるプロモーター配列。
16. 請求項10に記載のDNA配列を含むベクター。

17. コードされる蛋白質が発現する状態で請求項10に記載の組換えDNAを含む生物系。

18. 微生物である、請求項17に記載の生物系。

19. 植物である、請求項17に記載の生物系。

20. 請求項10に記載の組換えDNAにより形質転換された植物。

21. 組換えDNAがCa-AMP1をコードする、請求項20に記載の植物

。

22. 組換えDNAがBm-AMP1をコードする、請求項20に記載の植物

。

23. 請求項20-22のいずれか1項に記載の植物の種子および子孫。

24. 請求項1-8のいずれか1項に記載の蛋白質に暴露することを含む、真菌または細菌と対抗する方法。

25. 請求項9に記載の組成物に暴露することを含む、請求項24に記載の方法。

26. 請求項1-6のいずれか1項に記載の蛋白質を含有する有機材料から該蛋白質を得るための抽出方法であって、該有機材料をマセレーションおよび溶剤抽出することを含む方法。

27. 蛋白質が次いで遠心分離、クロマトグラフィーおよび透析により精製される、請求項26に記載の抽出方法。

28. 有機材料がトウガラシ属 (C a p s i c u m) の種子、コバンソウ属 (B r i z a) の種子、カタボジウム属 (C a t a p o d i u m) の種子、バプテisia属 (B a p t i s i a) の種子、ミクロセンシス属 (M i c r o s e n s i s) の種子、ヒエンソウ属 (D e l p h i n i u m) の種子よりなる群から選ばれる種子を含む、請求項26に記載の抽出方法。

29. 有機材料が請求項17に記載の生物系を含む、請求項26に記載の抽出方法。

30. 請求項1-6のいずれか1項に記載の蛋白質を製造する方法であって、蛋白質の化学合成を含む方法。

31. 請求項1-6のいずれか1項に記載の蛋白質を製造する方法であって、  
該蛋白質をコードする組換えDNA配列の発現を含む方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/GB 93/02179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C12N15/29 C12N15/82 C07K7/10 C12N1/21 A01H5/00  
A01N65/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 C12N C07K A01H A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEMISTRY vol. 31, no. 17, 5 May 1992, EASTON, PA US pages 4308 - 4314 BROEKAERT, W.F., ET AL. 'Antimicrobial peptides from Amaranthus caudatus seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins' cited in the application	1,6, 8-10, 25-28
Y	see the whole document	11-24, 31,32
Y	WO,A,92 15691 (ICI) 17 September 1992 see the whole document	11-24, 31,32

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 1994

Date of mailing of the international search report

22-02-1994

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/GB 93/02179

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,92 21699 (ICI) 10 December 1992 cited in the application  see the whole document ----	1,6, 8-10, 25-28
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS Abstract no. BR39:62656 see abstract & 90TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 1990. ABSTR. ANNU. MEET. AM. SOC. MICROBIOL. vol. 90, 1990 page 384 SIDDIQUI, R., ET AL. 'Antimicrobial and immunomodulating properties of Delphinium -denudatum extracts' ----	7
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 63 1977, Philadelphia, PA, US; abstract no. 28390, SABER, M.S.M. 'Antimicrobial substances in certain members of Solanaceae: IV. Detection of active principles in pepper plant' see abstract & ZENTRALBL. BAKTERIOL. PARASITENKD. INFEKTIONSKR. HYG. ZWEITE-NATURWISS. ABT. ALLG. LANDWIRTSCH. TECH. MIKROBIOL. vol. 131, no. 2, 1976 pages 110 - 112 ----	7
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 65 1978, Philadelphia, PA, US; abstract no. 73020, MOLOT, P.M., ET AL. 'Resistance of sweet pepper (Capsicum annum) to Phytophthora capsici Leon: III. Contamination induced antifungal activity in extracts from susceptible or resistant stems' see abstract & ANN. PHYTOPATHOL. vol. 8, no. 4, 1976 pages 399 - 410 -----	7

Form PCT/ISA/210 (continuation of record sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 93/02179

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9215691	17-09-92	AU-A- 1366492	06-10-92
		EP-A- 0576483	05-01-94
WO-A-9221699	10-12-92	AU-A- 1780092	08-01-93

Form PCT/ISA/210 (patent family name) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 0 1 N 63/00		A 9155-4H	
C 0 7 K 14/415		8318-4H	
C 1 2 N 5/10			
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B	
/(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,			
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M			
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG			
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,			
TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA,			
CZ, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, L			
K, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU			
, SD, SK, UA, US, VN			
(72) 発明者 オズボーン, ルパート・ウィリアム			
イギリス国ミドルセックス ティーダブリ			
ュー2 6 エスダブリュー, トウイッケン			
ハム, ウォーウィック・ロード 36			
(72) 発明者 リーズ, サラ・ブロンウェン			
イギリス国バークシャー アールジー12			
3 エックスエックス, ブラックネル, フォ			
レスト・パーク, マイケルディパー・ウェ			
イ 32			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**